

Rec'd PCT/PTO 13 JUL 2004

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
17. Juni 2004 (17.06.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 2004/050893 A1**

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: C12P 35/04

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2003/011480

(22) Internationales Anmeldedatum:  
16. Oktober 2003 (16.10.2003)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
102 56 656.9 3. Dezember 2002 (03.12.2002) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von  
US): RÖHM GMBH & CO. KG [DE/DE]; Kirschenallee,  
64293 Darmstadt (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): MENZLER, Ste-  
fan [DE/DE]; Waldspirale 8, 64289 Darmstadt (DE).  
BOLLER, Thomas [DE/DE]; Wilhelm-Leuschner-Strasse  
26, 64293 Darmstadt (DE). PETEREIT, Hans-Ulrich  
[DE/DE]; Händelstrasse 40, 64291 Darmstadt (DE).  
MEIER, Christian [DE/DE]; Kolbweg 35, 64295 Darm-  
stadt (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,  
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,  
CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,  
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,  
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,  
MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC,  
SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,  
UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,  
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),  
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,  
TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE,  
DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL,  
PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG,  
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Veröffentlicht:**

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden  
Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen  
eintreffen

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Ab-  
kürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Co-  
des and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der  
PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING CEPHALEXIN

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON CEPHALEXIN

(57) Abstract: The invention relates to a method for producing cephalixin with the aid of a penicillin amidase that is immobilized on a pearl-shaped, cross-linked and hydrophilic copolymer that binds to ligands having nucleophilic groups.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Cephalixin mit Hilfe einer auf einem perlför-  
migen, vernetzten hydrophilen, gegenüber Liganden mit nucleophilen Gruppen bindungsaktiven Mischpolymerisat immobilisierten  
Penicillinamidase.

501,140



WO 2004/050893 A1

## **Verfahren zur Herstellung von Cephalexin**

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Cephalexin mit Hilfe einer auf einem perlförmigen, vernetzten hydrophilen, gegenüber Liganden mit nucleophilen Gruppen bindungsaktiven Mischpolymerisat immobilisierten Penicillinamidase.

### Stand der Technik

Verfahren zur Synthese von halbsynthetischen Betalaktam Antibiotika durch Acylierung eines Betalaktam Rests (Betalaktamkern) mit einer aktivierten Seitenkette, wie etwa einem Amid oder einem Ester, unter Verwendung des Enzyms Penicillinacylase (Penicillinamidase) sind dem Fachmann gut bekannt.

Zumeist wird das Enzym dabei an einen festen, wasserunlöslichen Träger gebunden, und anschließend in wässriger Lösung mit dem Betalaktamkern und der aktivierten Seitenkette in Kontakt gebracht.

Nachteilig an den bisher offenbarten Verfahren ist die Tatsache, dass das Verhältnis der Synthese der gewünschten Verbindung durch das Enzym gegenüber der Hydrolyse der aktivierten Seitenkette zu wertlosen Seitenkettensäuren sowie auch zur Hydrolyse des gewünschten Produktes, der so genannte S/H-Wert, oft ungünstig ist, und eine wirtschaftliche Produktion erschwert.

Aus der WO 93/12250 ist es bekannt, dass der S/H-Wert bei der Synthese der halbsynthetischen Betalaktam-Antibiotika, Cephadroxil und Cephalexin durch auf Eupergit® (Röhm GmbH & Co. KG, Darmstadt, Deutschland, siehe auch Vergleichsbeispiel 1) immobilisierter Penicillinamidase aus *E. coli* durch die

Wahl der Reaktionsbedingungen günstig beeinflusst werden kann. Ein Einfluss der Natur des Trägermaterials wird hingegen nicht gelehrt. Nachteilig an dem in der WO 93/12250 gelehrt Verfahren ist insbesondere, dass das Cephalexin im Komplex mit beta-Naphthol aus dem Reaktionsgemisch isoliert wird, so dass nachfolgende Aufreinigungsschritte nötig sind, und Produktverluste auftreten.

Es wurde daher versucht, optimierte Trägermaterialien zu entwickeln. So offenbart die WO97/04086 eine Penicillinamidase aus *E. coli*, die auf einem Trägermaterial aus einem Quellmittel und einem Polymer mit freien Aminogruppen immobilisiert ist, sowie deren Verwendung zur Herstellung von Betalaktamderivaten. Das offenbarte Verfahren zur Herstellung von Cephalexin weist jedoch den Nachteil auf, dass der Betalaktamkern 7-Aminodesacetoxycephalosporansäure (7-ADCA) im dreifachen molaren Überschuss zu der aktivierten Seitenkette D-Phenylglycinamid (PGA) eingesetzt wird. Werden überstöchiometrische Mengen Betalaktamkern eingesetzt, muss der Kern im industriellen Maßstab recycelt werden, um wirtschaftlich arbeiten zu können. Dies ist teuer und führt zu Ausbeuteverlusten. Außerdem führt dieser Umstand auch zu Verunreinigungen im Produkt, da der Kern labil ist.

Die EP 0 730 035 lehrt ebenfalls die Herstellung von Cephalexin auf einem spezifischen Träger in akzeptablen Ausbeuten. Allerdings beträgt die Korngröße des verwendeten Trägermaterials (Emphaze™) nur 60-80 µm. Dies ist von großem Nachteil für technische Anwendungen. So haben mit solchem Material gepackte Chromatographiesäulen nur eine geringe Fließgeschwindigkeit.

Ein Trägermaterial für Enzyme wird in der DE 198 04 518 beschrieben. Es wird erwähnt, dass das Material Verwendung finden könne für die enzymatische

Synthese von Amoxycillin und Ampicillin. Eine Eignung für die Synthese von Cephalexin mittels immobilisierter Penicillinamidase wird nicht erwähnt.

### Aufgabe und Lösung

Angesichts des oben diskutierten Stands der Technik lag der vorliegenden Erfindung daher die Aufgabe zugrunde, ein verbessertes Verfahren für die Synthese von Cephalexin zur Verfügung zu stellen, welches die oben genannten Nachteile überwindet.

Insbesondere sollte dieses Verfahren die Realisierung eines günstigen S/H-Wertes ermöglichen. Weiterhin sollte das verwendete Trägermaterial eine für industrielle Verfahren günstige Korngröße von 120 bis 250  $\mu\text{m}$  aufweisen.

Diese Aufgabe wird gelöst durch das in Anspruch 1 definierte Verfahren. Bevorzugte Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Verfahrens sind in den auf Anspruch 1 zurückbezogenen Unteransprüchen definiert.

Insbesondere gelingt es auf nicht vorhersehbare und technisch einfache Weise, die obige Aufgabe zu lösen, indem man perlförmige, vernetzte hydrophile, gegenüber Liganden mit nucleophilen Gruppen bindungsaktive Trägerpolymermaterialien, die herstellbar sind durch inverse Perlpolymerisation einer Monomerenphase, die aus Monomeren und einem Verdünnungsmittel bestehen, wobei als Monomere

- (a) 5 - 40 Gew.-% hydrophile radikalisch polymerisierbare Monomere mit einer Vinylgruppe, die bei Raumtemperatur wenigstens 10 %-ige wässrige Lösungen bilden

- (b) 30 - 50 Gew.-% radikalisch polymerisierbaren Monomere mit einer Vinylgruppe und einer zusätzlichen funktionellen Gruppe, die in einer polymeranalogen Reaktion mit den nucleophilen Gruppen der Liganden kovalente Bindungen eingehen kann
- (c) 20 - 60 Gew.-% vernetzende radikalisch polymerisierbare Monomere mit zwei oder mehr ethylenisch ungesättigten polymerisierbaren Gruppen

mit der Maßgabe, dass sich a), b) und c) zu 100 Gew.-% addieren, enthalten sind und als Verdünnungsmittel ein Gemisch aus Methanol und Wasser im Verhältnis 1 : 1,0 bis 1 : 4,0 verwendet wird, wobei die Monomerenphase in einer kontinuierlichen Phase aus einem organischen Lösungsmittel aus einem aliphatischen Kohlenwasserstoff mit 5 - 7 Kohlenstoffatomen zu Tröpfchen verteilt ist, wobei das Verhältnis Monomerenphase zu kontinuierlicher Phase 1 : 2,0 bis 1 : 4,0 beträgt, und in dieser Form in Gegenwart von eines Polymerisationsinitiators und eines Schutzkolloids radikalisch polymerisiert werden, mit der Maßgabe, dass das Verhältnis der Monomeren zum Verdünnungsmittel 1 : 1,7 bis 1 : 2,4 beträgt, mit Penicillinamidase beschichtet, und diese beschichteten Träger in Kontakt bringt mit einer wässrigen Lösung, die

- (i) 7-Aminodesacetoxycephalosporansäure und
- (ii) D-Phenylglycinamid

in Verhältnissen von 1 : 2 bis 2 : 1, bevorzugt 1,5 : 1 bis 1 : 1,5, besonders bevorzugt in annähernd equimolaren Verhältnissen, d.h. in Verhältnissen von 1,2:1 bis 1:1,2 enthält.

Das verwendete Trägermaterial und das Verfahren zu seiner Herstellung sind in der DE 198 04 518 beschrieben.

### Ausführung der Erfindung

#### Herstellung des Trägermaterials

#### Monomere

Um die Hydrophilie des Monomerengemischs zu gewährleisten, muss dieses zum überwiegenden Teil aus hydrophilen Monomeren bestehen. Unter hydrophilen Monomeren sind solche Monomere zu verstehen, die bei Raumtemperatur wenigstens 10%-ige wässrige Lösungen bilden und vorzugsweise keine ionischen oder durch Säure- oder Basenzusatz ionisierbaren Gruppen enthalten.

Die Monomere a) sind 5 - 40, 8 - 35, insbesondere 9 - 12 Gew.-% hydrophile radikalisch polymerisierbare Monomere mit einer Vinylgruppe, die bei Raumtemperatur wenigstens 10 %-ige wässrige Lösungen bilden.

Als Monomere a) sind insbesondere Acrylamid und/oder Methacrylamid geeignet, wobei Methacrylamid bevorzugt wird. Weitere Beispiele sind Hydroxyalkylester von ungesättigten polymerisierbaren Carbonsäuren, wie Hydroxyethylacrylat und Hydroxyethylmethacrylat oder N-Vinylpyrrolidon.

Monomere b) sind 30 - 50, bevorzugt 35 - 45 Gew.-% radikalisch polymerisierbaren Monomere mit einer Vinylgruppe und einer zusätzlichen funktionellen Gruppe, bevorzugt einer Oxirangruppe (Epoxygruppe), die in einer polymeranalogen Reaktion mit den nucleophilen Gruppen der Liganden

kovalente Bindungen eingehen kann. Insbesondere Oxirangruppen sind geeignet, um Liganden unter Erhaltung ihrer biologischen Aktivität zu binden.

Bevorzugte Monomere b) sind Glycidylmethacrylat und/oder Allylglycidylether. Besonders bevorzugt werden gleichzeitig beide Monomere in etwa gleichen Mengen eingesetzt.

Monomere c) sind 20 - 60, insbesondere 25 - 55, besonders bevorzugt 40 - 55 Gew.-% hydrophile, vernetzende radikalisch polymerisierbare Monomere mit zwei oder mehr ethylenisch ungesättigten polymerisierbaren Gruppen.

Bevorzugte Monomere c) sind N,N'-Methylen-bis-Acrylamid oder N,N'-Methylen-bis-Methacrylamid. N,N'-Methylen-bis-Methacrylamid wird besonders bevorzugt. Gegebenenfalls können auch 0 - 10 Gew.-% weiterer vernetzender, radikalisch polymerisierbarer Monomere mit zwei oder mehr ethylenisch ungesättigten polymerisierbaren Gruppen eingesetzt werden. Geeignet sind hydrophile Di(meth)acrylate, wie z. B. Polyethylenoxid-Di(meth)acrylate.

Die Monomere a), b) und c) addieren sich jeweils zu 100 Gew.-%.

#### Verdünnungsmittel

Die Monomerenphase besteht aus den Monomeren a) bis c), die in einem Verdünnungsmittel, das ein Gemisch aus Methanol und Wasser im Verhältnis 1 : 1,0 bis 1 : 4,0 sein muss, gelöst sind. Besonders günstige Mischungsverhältnisse für Methanol und Wasser liegen bei 1 : 1,2 bis 1 : 2,5, insbesondere bei 1 : 1,3 bis 1 : 1,7.

### Verhältnis Monomere zu Verdünnungsmittel

Besonders kritisch ist das Verhältnis Monomere zu Verdünnungsmittel. Dieses muss im Bereich von 1 : 1,7 bis 1 : 2,4, besonders bevorzugt im Bereich von 1,9 bis 2,1 liegen.

### Kontinuierliche Phase

Als kontinuierliche Phase eignet sich ein organisches Lösungsmittel, das ein aliphatischer Kohlenwasserstoff mit 4 bis 7 C-Atomen ist. Bevorzugt ist n-Heptan und besonders bevorzugt Cyclohexan.

### Verhältnis Monomerenphase/kontinuierlicher Phase

Das Verhältnis von der Monomerenphase zur kontinuierlichen Phase, gebildet durch das organische Lösungsmittel muss bei 1 : 2,0 bis 1 : 4,0, bevorzugt zwischen 1 : 2,8 bis 1 : 3,3.

### Weitere Verfahrensbedingungen

Als weitere Bestandteile enthält die suspendierte Monomerphase in an sich bekannter Weise Polymerisations-Initiatoren, bevorzugt sind schwefelfreie Initiatoren, besonders bevorzugt ist 4,4'-Azobis-(4-Valeriansäure), sowie Schutzkolloide (Emulgatoren), wie z. B. ein Mischpolymerisat aus 95 Teilen n-Butylmethacrylat und 5 Teilen 2-Trimethylammoniummethacrylat-Chlorid mit Molekulargewichten (Gewichtsmittel) im Bereich von 30.000 bis 80.000.

Die Perlpolymerisation (auch als Suspensionspolymerisation bezeichnet) wird ansonsten in bekannter Weise ausgeführt, indem z. B. die kontinuierliche



Phase und dem Schutzkolloid vorgelegt wird und die Monomerenphase, in der sich auch der Initiator befindet unter Rühren z. B. bei 40 bis 60 °C in der organischen Phase verteilt wird und anschließend auf 60 - 70 °C erhitzt wird. Das Wasser/Methanol-Gemisch kann z. B. über einen Zeitraum von 6 Stunden nahezu vollständig azeotrop ausgekreist werden. Man lässt den Ansatz für ca. 3 - 5 Stunden zu Ende reagieren und kühlt anschließend auf Raumtemperatur ab. Die entstandenen Perlen werden abgesaugt und z. B. für 12 Stunden im Vakuum getrocknet. Alternativ dazu können die Perlpolymerisate auch abfiltriert und mit Wasser gewaschen werden. Bevorzugt wird eine Trocknung in einem Wirbelschichttrockner vorgenommen, da sich auf diese Weise Lösungsmittelreste besonders effektiv entfernen lassen.

Die erhaltenen Polymerperlen (= Trägerpolymermaterial) haben eine Größe im Bereich von 50 bis 500 µm, insbesondere von 120 bis 250 µm.

Unter der Bindungskapazität wird diejenige enzymatische Aktivität verstanden, die sich bei maximaler Beladung des Trägerpolymermaterials mit einem bestimmten Enzym erreichen lässt. Die Bindungskapazität wird ausgedrückt als Penicillinamidase-Aktivität in Units pro g Trägerpolymerperlen [U/g feucht]. Die Bindungskapazität der erfindungsgemäßen Trägerpolymerperlen beträgt bei dieser Meßmethode mindestens 220 [U/g feucht].

Die Quellbarkeit der Polymerperlen in Wasser wird ausgedrückt durch die Quellungszahl [ml feucht / ml trocken]. Die erfindungsgemäßen Trägerpolymerperlen weisen eine Quellungszahl von nicht mehr als 1,5 auf.

#### Beschichtung des erfindungsgemäß verwendbaren Trägermaterials

In den Beispielen wird das Trägermaterial bei pH 7,5 in Kaliumphosphatpuffer beschichtet. Es ist dem Fachmann jedoch klar, dass es eine ganze Vielzahl von

weiteren Verfahren gibt, mit denen eine zufriedenstellende Beschichtung gewährleistet wird.

#### Synthese von Cephalexin

Die Edukte (i) 7-Aminodesacetoxycephalosporansäure und (ii) D-Phenylglycinamid werden in Konzentrationen von 10-500 mM, bevorzugt 50-300 mM und besonders bevorzugt von 150-250 mM eingesetzt.

#### Vorteilhafte Wirkungen der Erfindung

Das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht die Synthese von Cephalexin mit günstigem S/H-Verhältnis (Synthese/Hydrolyse). Vorteilhaft ist es dabei, daß dies unter Verwendung eines Trägermaterials mit Teilchengrößen im Bereich von 50 – 500 µm, insbesondere von 120 bis 250 µm erreicht wird. Dadurch werden bessere anwendungstechnische Eigenschaften erzielt, z. B. höhere Fließgeschwindigkeiten in Festbettreaktoren. Aus den höheren Fließgeschwindigkeiten resultieren bessere Raum-Zeit-Ausbeuten. Auch in Batchverfahren bieten die größeren Trägerteilchen Vorteile, da sie schneller abfiltriert werden können. Dies erhöht wiederum die Raum-Zeit-Ausbeute und damit die Wirtschaftlichkeit des Prozesses.

### Beispiele

(Die folgende Bestimmungsmethode ist dem Fachmann auf dem Gebiet poröser Trägerpolymermaterialien an sich geläufig und wird nur der Vollständigkeit halber aufgeführt)

Bestimmung der Bindungskapazität für Penicillinamidase (= Penicillin G-Acylase) aus *E. coli* (EC 3.5.1.11)

#### a) Kovalente Bindung von Penicillinamidase an das Trägerpolymermaterial

1 g Trägerpolymermaterial werden zu 1530 Units Penicillinamidase in 5 ml sterilem 1 M Kalium-Phosphat-Puffer pH 7,5 gegeben und für 48 h bei 23 °C inkubiert.

Anschließend werden die Polymerperlen auf eine Fritte aus gesintertem Glas (Porösität 2 oder 3) gegeben und zweimal mit entionisiertem Wasser und anschließend zweimal mit 0,1 M Kalium-Phosphatpuffer pH 7,5, enthaltend 0,05 % Ethyl-4-hydroxybenzoat, mittels Absaugens auf der Fritte gewaschen. Das Feuchtgewicht der erhaltenen, mit Penicillin-Acylase beladenen Perlen wird bestimmt.

#### b) Bestimmung der Bindungskapazität

250 - 300 mg feuchtes mit Penicillinamidase gekoppeltes Trägerpolymermaterial (Polymerperlen) werden in 20 ml einer 2 %-igen Penicillin-G-Lösung in 0,05 M Kalium-Phosphatpuffer pH 7,5, enthaltend 0,05 % Ethyl-4-hydroxybenzoat, bei 37 °C gegeben. Unter gleichmäßiger Rührung

erfolgt eine Titration frei gewordener Phenylelessigsäure mit 0,5 M NaOH bei einem konstantem pH-Wert von 7.8 für die Dauer von 10 Minuten, wobei der Verbrauch an NaOH aufgezeichnet wird.

Anschließend werden die Polymerperlen wie unter a) über eine Glasfritte mittels Durchsaugen von 20 ml 0,05 M Kalium-Phosphatpuffer pH 7,5, enthaltend 0,05 % Ethyl-4-hydroxybenzoat, gewonnen und die Messung zweimal wiederholt.

c) Berechnung der Bindungskapazität

Der lineare Bereich der Messkurven (üblicherweise der Bereich von 1 - 5 min) wird für die Berechnung zugrunde gelegt und auf ein 10 min Intervall extrapoliert. Die Bindungskapazität wird als Penicillinamidase Einheiten pro g feuchten Trägerpolymermaterials (U/g feucht) angegeben. Eine Einheit entspricht einem  $\mu\text{mol}$  hydrolysiertem Penicillin G pro Minute ( $\mu\text{mol}/\text{min}$ ); 1 l 0,5M NaOH ist dabei äquivalent zu 500  $\mu\text{mol}$  hydrolysiertem Penicillin G. (Der Wassergehalt des Trägerpolymermaterials ist in etwa konstant und kann daher vernachlässigt werden.)

Vergleichsbeispiel 1

1530 Units Penicillinamidase aus *E. coli* werden in 6 ml sterilem 1 M Kaliumphosphatpuffer, pH 7,5 gelöst. Die Lösung wird zu 1 g Eupergit® C (Röhm GmbH & Co. KG, Darmstadt, Deutschland) gegeben, und die erhaltene Suspension wird 72 Stunden bei 23° C inkubiert. Die Polymerperlen werden auf einem gesinterten Gläfilter gesammelt und mit 0,1 M Kaliumphosphat-Puffer gewaschen. Die nachfolgende Cephalixin-Synthese und die Bestimmung des S/H-Wertes folgen den Beispielen 5 bzw. 6.

Eupergit® C (ein Copolymer aus N,N'-methylenbis-methacrylamid, Allylglycidylether und Methacrylamid) sowie Verfahren zu seiner Herstellung werden in der DE-C 27 22 751, der US-A 4 90 713 bzw. der US-A 45 11 694 beschrieben.

### Vergleichsbeispiel 2

Der WO 97/04086 folgend wird unter Verwendung des dort offenbarten Typ A Enzyms bzw. Typ B Enzyms eine Cephalexin-Synthese wie in Beispiel 6 beschrieben durchgeführt.

### Vergleichsbeispiel 3

Auf Sepabeads® FP-EP bzw. Sepabeads® FP-EP/G (Resindion S.R.l., Mailand, Italien) wird Penicillinamidase aus *E. coli* immobilisiert wie in Vergleichsbeispiel 1 gezeigt. Die nachfolgende Cephalexin-Synthese und die Bestimmung des S/H-Wertes folgen den Beispielen 5 bzw. 6.

Sepabeads® FP-EP bzw. Sepabeads® FP-EP/G ist ein hochpolymeres vernetztes acrylisches Copolymer, welches wie Eupergit® Oxirangruppen trägt. Die durchschnittliche Teilchengröße beträgt nach Herstellerangaben 150-300 µm.

#### Vergleichsbeispiel 4

Ermittlung der Fließgeschwindigkeit einer mit Emphaze™ bzw. dem erfindungsgemäß verwendbaren Material gepackten Chromatographiesäule.

Material: Emphaze Ultralink™ Biosupport Medium, Lot#DC53515, Pierce, mittlere Teilchengröße nach Herstellerangaben 50-80 µm;  
Erfindungsgemäß verwendbares Material, mittlere Teilchengröße 208 µm.

Chromatographiesäulen aus Borsilikatglas mit Glasfrittenboden und Polypropylenendkappen (Abmessung der Säule 1x20 cm) wurden leer auf eine vergleichbare Auslaufgeschwindigkeit geprüft. Die Trägermaterialien wurden über Nacht in Wasser suspendiert und anschließend mit Wasser in die jeweilige Säule gespült und durch Sedimentation und langsames Auslaufen der Flüssigkeit wurde ein gepacktes Bett mit einer Höhe von 6,5 cm erhalten. Durch leichtes Klopfen wurden eventuelle Hohlräume entfernt. Die oben offenen Säulen hatten durch Wasserzulauf eine konstante Wassersäule von 23 cm. Die Fließgeschwindigkeit wurde nur durch den hydrostatischen Druck erzielt. Mittels Stoppuhr und 10ml-Meßzylinder wurde die Fließgeschwindigkeit bestimmt.

Für das erfindungsgemäß verwendbare Präparat wurde eine Fließgeschwindigkeit von 4,25 ml pro Minute bestimmt. Für Emphaze™ wurde eine Fließgeschwindigkeit von 0.71 ml pro Minute bestimmt. Die Eignung sphärischer Partikel zum Betrieb in Festbettreaktoren ist umso besser, je höher die Fließgeschwindigkeit ist (höhere Raum-Zeit-Ausbeute). Der Druckabfall in Festbettreaktoren lässt sich auch mathematisch berechnen: K. Buchholz und B. Gödelmann in „Characterization of immobilized biocatalysts“, Dechema

Monographien Band 84, Hrsg. K. Buchholz, VCH Weinheim 1979, Seiten 128-129).

Man erkennt deutlich die gegenüber Emphaze™ besseren anwendungstechnischen Eigenschaften des erfindungsgemäß einsetzbaren Materials für den Einsatz in Festbettreaktoren.

### Beispiele 1 - 3

Übereinstimmende Versuchsbedingungen in den Beispielen 1 - 3:

In einem 2 l Rührkolben mit Thermometer, Wasserabscheider, Rückflusskühler, Stickstoffeinleitungsrohr werden ein organisches Lösungsmittel, 3 g eines Mischpolymerisats aus 95-Teilen n-Butylmethacrylat und 5 Teilen 2-Trimethylammoniummethacrylat-Chlorid als Schutzkolloid und 5 g Trockeneis vorgelegt. Unter Rühren und Durchleiten von Stickstoff wird bei 50 °C eine Monomerenphase bestehend aus Wasser und Methanol im Verhältnis 1 : 1,5 (Beispiel 1) bzw. aus Formamid (Beispiele 2 und 3) als Verdünnungsmittel, sowie

10 g Methacrylamid,  
20 g Allylglycidylether,  
20 g Glycidylmethacrylat und  
50 g Methylen-bis-methacrylamid

sowie

2 g 4,4'-Azobis-4-cyanovaleriansäure (als Polymerisationsinitiator)

in der organischen Phase verteilt und anschließend zum Sieden bei 65 - 70 °C erhitzt. Der Ansatz wird für ca. 6 h inkubiert und anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt. Die entstandenen Polymerperlen werden abgesaugt, gewaschen und im Wirbelschichttrockner getrocknet. Anschließend wird die Bindungskapazität für Penicillinamidase [U/g feucht] und die Quellzahl bestimmt [ml feucht/ml trocken] bestimmt.

Die wesentlichen Versuchsparameter und die Ergebnisse der Beispiele 1 - 3 sind der nachstehenden Tabelle zu entnehmen.



	Beispiel 1 (erfindungsgemäß)	Beispiel 2 (Vergleichsbeispiel)	Beispiel 3 (Vergleichsbeispiel)
Organisches Lösungsmittel (kontinuierliche Phase)	952 g Cyclohexan	669 g Cyclohexan	530 g n-Heptan + 530 g Perchlorethylen
Monomere insgesamt	100 g	100 g	100 g
Verdünnungsmittel	80 g Methanol + 120 g Wasser (= 1 : 1,5)	263 g Formamid	264 g Formamid
Monomere + Verdünnungsmittel (Monomerenphase)	300 g	363 g	364 g
Verhältnis Monomere/ Verdünnungsmittel	1 : 2	1 : 2,63	1 : 2,64
Verhältnis Monomerenphase/ kontinuierliche Phase	1 : 3,2	1 : 1,8	1 : 2,9
Bindungskapazität für Penicillinamidase (1530 U) [U/g feucht]	252	194	192
Quellzahl [ml feucht/ ml trocken]	1,3	4,0	3,9

#### Beispiel 4

##### Synthese von Cephalexin

Die Reaktion wird bei 25° C und pH 7.5 in einem Festbettreaktor durchgeführt. 10 ml einer wässrigen Lösung eines Gemisches aus 0,2 M 7-ADCA und 0,2 M D-Phenylglycinamid werden über eine Säule mit 0,5 ml der immobilisierten Penicillinamidase geführt. Während der Reaktion wird der pH-Wert durch Zusatz von HCl in einem angeschlossenen gerührten Vorratsbehälter konstant gehalten. Zu bestimmten Zeitabständen werden Proben entnommen und wie in Beispiel 5 gezeigt mittels HPLC analysiert.

#### Beispiel 5

Die Produkte der Reaktion aus Beispiel 4 sowie der Vergleichsbeispiele 1 bis 3 wurden durch HPLC unter Verwendung einer RP -8 Säule (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) analysiert. Als Laufmittel wurde steriler 67 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,5 verwendet. Cephalexin wurde mit einer 30 %igen (Volumen/Volumen) wässrigen Methanol-Lösung eluiert.

Aus der HPLC-Analyse wurde die Synthesegeschwindigkeit von Cephalexin ( $V_{\text{Ceph}}$ ) sowie die Hydrolysegeschwindigkeit von D-Phenylglycin ( $V_{\text{D-PhG}}$ ) bestimmt und daraus der S/H-Wert (Verhältnis Synthesegeschwindigkeit/Hydrolysegeschwindigkeit ( $V_{\text{Ceph}}/V_{\text{D-PhG}}$ )) errechnet. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle dargestellt:

Enzymquelle	Träger/Immobilisate	$V_{\text{Ceph}}/V_{\text{D-PhG}}$
<i>E. coli</i>	erfindungsgemäß	4,6
<i>E. coli</i>	Typ A aus WO 97/04086 (s. Vergleichsbeispiel 2)	3,3
<i>E. coli</i>	Typ B aus WO/97/04086 (s. Vergleichsbeispiel 2)	3,3
<i>E. coli</i>	Vergleichsbeispiel 1	3,5
<i>E. coli</i>	Vergleichsbeispiel 3 (Sepabeads FP-EP)	3,2
<i>E. coli</i>	Vergleichsbeispiel 3 (Sepabeads FP-EP/G)	2,9

Der Wert für das erfindungsgemäße Verfahren setzt sich aus 7 parallel durchgeführten Versuchsreihen zusammen, die folgende S/H-Werte ergaben:  
5,3; 4,7; 3,6; 4,6; 4,3; 5,2; 4,7;

Man erkennt deutlich den gegenüber den Vergleichsbeispielen signifikant um ca. 30% verbesserten S/H-Wert, der mit dem erfindungsgemäßen Verfahren erreichbar ist.

## PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zur Herstellung von Cephalexin, dadurch gekennzeichnet, dass perlformige, vernetzte hydrophile, gegenüber Liganden mit nucleophilen Gruppen bindungsaktive Trägerpolymermaterialien, die herstellbar sind durch inverse Perlpolymerisation einer Monomerenphase, die aus Monomeren und einem Verdünnungsmittel bestehen, wobei als Monomere
- (a) 5 - 40 Gew.-% hydrophile radikalisch polymerisierbare Monomere mit einer Vinylgruppe, die bei Raumtemperatur wenigstens 10 %-ige wässrige Lösungen bilden,
  - (b) 30 - 50 Gew.-% radikalisch polymerisierbare Monomere mit einer Vinylgruppe und einer zusätzlichen funktionellen Gruppe, die in einer polymeranalogen Reaktion mit den nucleophilen Gruppen der Liganden kovalente Bindungen eingehen kann,
  - (c) 20 - 60 Gew.-% vernetzende radikalisch polymerisierbare Monomere mit zwei oder mehr ethylenisch ungesättigten polymerisierbaren Gruppen,
- mit der Maßgabe, dass sich a), b) und c) zu 100 Gew.-% addieren, enthalten sind und als Verdünnungsmittel ein Gemisch aus Methanol und Wasser im Verhältnis 1 : 1,0 bis 1 : 4,0 verwendet wird, wobei die Monomerenphase in einer kontinuierlichen Phase aus einem organischen Lösungsmittel aus einem aliphatischen Kohlenwasserstoff mit 5 - 7 Kohlenstoffatomen zu Tröpfchen verteilt ist, wobei das Verhältnis Monomerenphase zu kontinuierlicher Phase 1 : 2,0 bis 1 : 4,0 beträgt, und in dieser Form in Gegenwart von eines Polymerisationsinitiators und eines Schutzkolloids radikalisch polymerisiert werden, mit der Maßgabe, dass das Verhältnis der Monomeren zum Verdünnungsmittel 1 : 1,7 bis 1 : 2,4 beträgt, mit Penicillinamidase beschichtet werden, und diese beschichteten Träger in Kontakt gebracht werden mit einer wässrigen Lösung, die

- (i) 7-Aminodesacetoxycephalosporansäure und
- (ii) D-Phenylglycinamid

im Verhältnis von 1:2 bis 2:1, enthält.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass als Monomere

- a) Acrylamid und/oder Methacrylamid
- b) Glycidylmethacrylat und/oder Allylglycidylether
- c) N,N'-Methylen-bis-Acrylamid oder N,N'-Methylen-bis-

Methacrylamid eingesetzt werden.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass als organisches Lösungsmittel Cyclohexan verwendet wird.

4. Verfahren nach mindestens einem der vorstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Penicillinamidase aus *E. coli* stammt.

5. Verwendung eines Trägerpolymermaterials nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 4 zur Synthese von Cephalexin.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP 04/11480

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12P35/04

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DE 198 04 518 A (ROEHM GMBH) 12 August 1999 (1999-08-12) cited in the application the whole document	1-5
A	JANSSEN MICHEL H A ET AL: "Evaluation of the performance of immobilized penicillin G acylase using active-site titration" BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING, vol. 78, no. 4, 20 May 2002 (2002-05-20), pages 425-432, XP002274659 & ISSN: 0006-3592 the whole document	1-5
A	WO 97/04086 A (GIST BROCADES BV ; VROOM ERIK DE (NL)) 6 February 1997 (1997-02-06) cited in the application the whole document	1-5
-/--		

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \* & \* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

23 March 2004

Date of mailing of the international search report

16/04/2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Douschan, K

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP 11480

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>US 4 582 860 A (BIGWOOD MICHAEL P ET AL) 15 April 1986 (1986-04-15) the whole document</p>	1-5

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP 11480

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
DE 19804518	A	12-08-1999	DE 19804518 A1	12-08-1999
			AT 236935 T	15-04-2003
			AU 2520599 A	23-08-1999
			CN 1291200 T	11-04-2001
			DE 59904952 D1	15-05-2003
			DK 1053258 T3	28-07-2003
			WO 9940122 A1	12-08-1999
			EP 1053258 A1	22-11-2000
			ES 2194440 T3	16-11-2003
			JP 2002502892 T	29-01-2002
			PL 342210 A1	21-05-2001
WO 9704086	A	06-02-1997	AU 6659296 A	18-02-1997
			CN 1190990 A	19-08-1998
			WO 9704086 A1	06-02-1997
			EP 0839192 A1	06-05-1998
			JP 2001527381 T	25-12-2001
			US 6060268 A	09-05-2000
US 4582860	A	15-04-1986	BR 8406277 A	01-10-1985
			CA 1228196 A1	13-10-1987
			EP 0146329 A2	26-06-1985
			ES 8800348 A1	01-01-1988
			JP 1762353 C	28-05-1993
			JP 4058311 B	17-09-1992
			JP 60221090 A	05-11-1985
			US 4612288 A	16-09-1986
			ZA 8409758 A	26-02-1986



# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationale Patentnummer

PCT/EP/11480

**A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES**  
IPK 7 C12P35/04

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)  
IPK 7 C12P

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	DE 198 04 518 A (ROEHM GMBH) 12. August 1999 (1999-08-12) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	1-5
A	JANSSEN MICHEL H A ET AL: "Evaluation of the performance of immobilized penicillin G acylase using active-site titration" BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING, Bd. 78, Nr. 4, 20. Mai 2002 (2002-05-20), Seiten 425-432, XP002274659 & ISSN: 0006-3592 das ganze Dokument	1-5
A	WO 97/04086 A (GIST BROCADES BV ; VROOM ERIK DE (NL)) 6. Februar 1997 (1997-02-06) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	1-5
-/--		



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

\*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

\*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

\*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

\*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

\*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*G\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

23. März 2004

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

16/04/2004

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Douschan, K

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationaler Aktenzeichen  
PCT/EPC/11480

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>US 4 582 860 A (BIGWOOD MICHAEL P ET AL)</p> <p>15. April 1986 (1986-04-15)</p> <p>das ganze Dokument</p> <p>-----</p>	1-5

# INTERNATIONALE RESEARCHENBERICHT

Internationaler Kennzeichen  
PCT/EP/11480

Im Rechenbericht angeführtes Patentedokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
DE 19804518 A	12-08-1999	DE 19804518 A1	12-08-1999
		AT 236935 T	15-04-2003
		AU 2520599 A	23-08-1999
		CN 1291200 T	11-04-2001
		DE 59904952 D1	15-05-2003
		DK 1053258 T3	28-07-2003
		WO 9940122 A1	12-08-1999
		EP 1053258 A1	22-11-2000
		ES 2194440 T3	16-11-2003
		JP 2002502892 T	29-01-2002
		PL 342210 A1	21-05-2001
WO 9704086 A	06-02-1997	AU 6659296 A	18-02-1997
		CN 1190990 A	19-08-1998
		WO 9704086 A1	06-02-1997
		EP 0839192 A1	06-05-1998
		JP 2001527381 T	25-12-2001
		US 6060268 A	09-05-2000
US 4582860 A	15-04-1986	BR 8406277 A	01-10-1985
		CA 1228196 A1	13-10-1987
		EP 0146329 A2	26-06-1985
		ES 8800348 A1	01-01-1988
		JP 1762353 C	28-05-1993
		JP 4058311 B	17-09-1992
		JP 60221090 A	05-11-1985
		US 4612288 A	16-09-1986
		ZA 8409758 A	26-02-1986